

= DE 196 496 45.4
= US 08/ 979, 154

Beschreibung

- 5 Mehrfach funktionelles Ligandensystem zur zielzellspezifischen Übertragung von Nukleotidsequenzen

Die Erfindung bezieht sich auf ein mehrfach funktionelles Ligandensystem zur zielzellspezifischen Übertragung von Nukleotidsequenzen bestehend aus
10 mindestens einem zielzellspezifischen Liganden, mindestens einem Linker und mindestens einem genkonstruktsspezifischen Liganden, wobei der genkonstruktsspezifische Ligand einen direkt oder indirekt an das Genkonstrukt bindenden Antikörper oder einen Teil davon enthält, sowie die Verwendung des Ligandensystems zur Herstellung eines Heilmittels oder eines Impfstoffes zur
15 Behandlung oder zur Vorbeuge einer Erkrankung der Haut, Schleimhaut, des Nervensystems, der inneren Organe, der Gerinnung, des blutbildenden Systems, des Immunsystems, der Muskulatur, des Stützgewebes oder der Gelenke.

Bei der Übertragung von Genen in eine Zelle ist die Bindung des Genkonstruktes an
20 die Zelloberfläche eine notwendige, wenn auch nicht hinreichende Voraussetzung.

Je stärker diese Bindung ist, um so größer ist die Erfolgswahrscheinlichkeit, daß das Genkonstrukt von der Zelle aufgenommen und in der Zelle transkribiert wird.

25 Je zellspezifischer diese Bindung ist, um so eher wird das Genkonstrukt vorwiegend oder nur an die Zielzelle gebunden und von dieser aufgenommen. Die Spezifität der Bindung eines Genkonstruktes an die Zielzelle ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn neben dem Genkonstrukt und der Zielzelle Zellen anderer Art vorhanden sind und das Genkonstrukt jedoch bevorzugt oder ausschließlich von der
30 Zielzelle aufgenommen werden soll.

Um eine zellspezifische Bindung eines Genkonstruktes zu ermöglichen, wurden bereits verschiedene Technologien entwickelt. Allen diesen Technologien ist gemeinsam, daß sie die Bindung

- eines Liganden an seinen auf der Zellmembran exprimierten Rezeptor oder
- eines Antikörpers an sein auf der Zellmembran exponiertes Antigen oder Hapten nutzen.

5 So wurden beispielsweise mit gentechnologischen Methoden Liganden wie Heregulin (Han et al., PNAS 92, 9747 (1995)), Erythropoietin (Kasahara et al., Science 266, 1373 (1994)), Antikörperfragmente wie "single chain Fv" (Marin et al., J. Virol. 70, 2957 (1996)) oder Rezeptoren wie der extrazelluläre Teil des Fc-Rezeptors (Dougherty et al., Transfusion Science 17, 121 (1996)) in die
10 Hüllglykoproteine von retroviralen Vektoren eingebaut und hierdurch eine Zielzellspezifität bewirkt.

Desweiteren wurden mit chemischen Methoden Liganden wie das
Asialoglykoprotein (Wu et al., J. Biol. Chem. 269, 1152 (1994)) oder synthetische
15 Derivate hiervon (Merwin et al., Bioconjugate Chem. 5, 612 (1994)) mit Polylysin verknüpft und dieses entweder mit dem Genkonstrukt komplexiert oder an Hüllproteine von adenoviralen Vektoren chemisch gebunden. Eine weitere Methode ist, Liganden an Streptavidin zu binden, welches sich wiederum an Biotin, konjugiert an die Phospholipidkopfguppen von Liposomen bindet, wobei die Liposomen mit
20 Genkonstrukten komplexiert sind (Redelmeir et al. Drug Deliv. J. Deliv. Targeting Therap. Agents 2, 98, (1995)). Ein erstes Ligandensystem wurde von Fominaya et al. J. Biol. Chem. 271, 10560, 1996 vorgestellt. Dieses Ligandensystem besteht aus einem Antikörperfragment spezifisch für den Erb B2-Rezeptor auf Tumorzellen, dem fusiogenen Peptid des Pseudomonas Exotoxin A und der DNA bindenden Domäne
25 des Gal-4-Proteins der Hefe, die an die korrespondierende Gal-4-Bindesequenz, eingefügt in ein das Transgen enthaltendes Plasmid, bindet. Dieses Ligandensystem führt zwar zu einer zielzellspezifischen Transfektion, besitzt jedoch den Nachteil der Immunogenität des Gal-4-Proteins der Hefe.

30 Somit haben alle bislang bekannten Methoden das Problem der zielzellspezifischen Bindung von Vektoren für eine weitgehend zielzellspezifische Transduktion von Zellen nur unzureichend lösen können.

Die wesentlichen Gründe liegen

- in der Beeinträchtigung der Funktion der modifizierten viralen Vektoren
- der beträchtlichen Komplexität und Größe der Ligandensysteme
- 5 - der Immunogenität und Verträglichkeit von heterologen oder modifizierten Proteinen oder des verwendeten Streptavidin-Biotin-Kopplungssystems
- der unzureichenden Fähigkeit des gebundenen Genkonstruktes zur zielzellspezifischen Transduktion von Zellen.

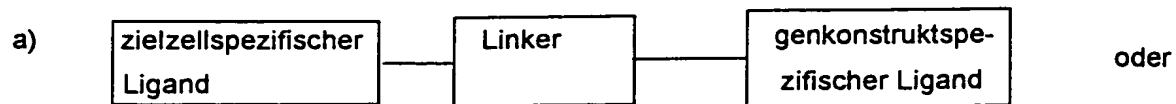
10 Es besteht somit immer noch ein großer Bedarf an einem einfach herstellbaren, funktionsfähigen Liganden für die zielzellspezifische Bindung von viralen und nicht-viralen Vektoren.

Allgemeine Beschreibung des Ligandensystems

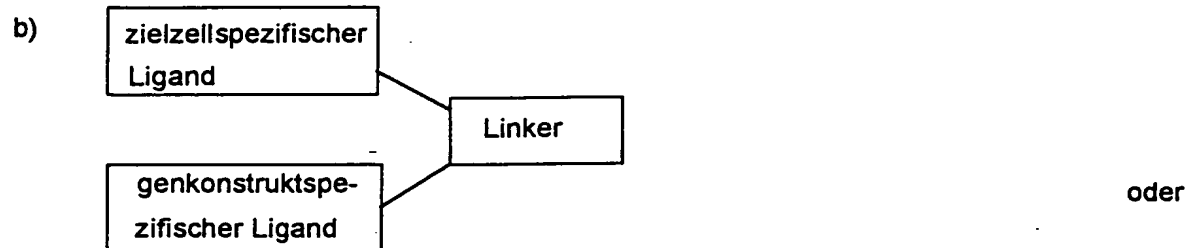
15

Gegenstand der Erfindung ist ein Ligandensystem, welches sich durch seine einfache Herstellung, Anwendung, Funktionsfähigkeit und Verträglichkeit auszeichnet.

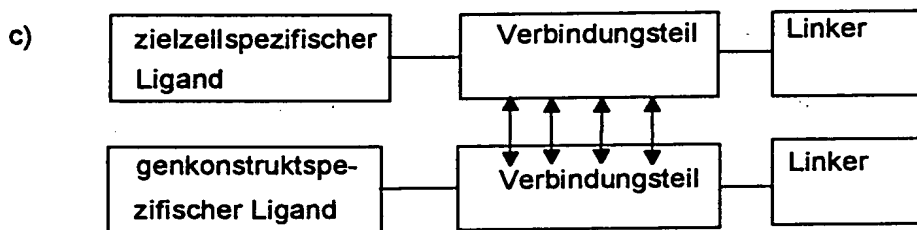
20 Dieses Ligandensystem besteht im Prinzip aus einem zielzellspezifischen Liganden und einem genkonstruktsspezifischen Liganden, welche miteinander über oder mit einem Linker nach folgenden Schemata verbunden sind:



5



10



15

Der zielzellspezifische Ligand (ZS-Ligand) stellt ein Molekül dar, welches an eine Determinante auf der Oberfläche der Zielzelle bindet.

20

Der Linker stellt ein Molekül dar, welches im einfachsten Falle den zielzellspezifischen und dem genkonstrukt-spezifischen Liganden miteinander verbindet. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung hat der Linker fusiogene Eigenschaften.

25

Der genkonstrukt-spezifische Ligand (GS-Ligand) stellt ein Molekül dar, welches an ein Genkonstrukt direkt oder indirekt bindet.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform c) sind der ZS-Ligand und der GS-Ligand jeweils über ein Verbindungsteil miteinander und jeweils mit einem Linker verbunden. Diese Ausführungsform kann je nach Bedarf in verschiedener Form variiert werden (z.B. 1x Linker, 2x ZS-Ligand, 1x GS-Ligand oder 1x Linker, 1x ZS-Ligand, 2x GS-Ligand).

Die Verbindungen zwischen dem ZS-Liganden, dem Linker und dem GS-Liganden können chemisch kovalent oder über unterschiedliche Ladungen erfolgen. Das Ligandensystem kann jedoch auch als Fusionsprotein über rekombinierte DNA hergestellt werden.

5

Das Genkonstrukt entsprechend der Erfindung kann zum einen eine nackte RNA oder eine nackte DNA, zum anderen eine nackte RNA oder eine nackte DNA im Gemisch mit einem nichtviralen Träger oder zum dritten ein Virus sein.

10 Ein Ligandensystem entsprechend der vorliegenden Erfindung wird mit dem Genkonstrukt vermischt und der so erhaltene Komplex den zu transduzierenden Zellen zugefügt oder dem Patienten verabreicht.

15 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann der ZS-Ligand ein Wirkstoff, ein Teil des Wirkstoffes oder ein Analogon des Wirkstoffes sein, welcher an einen Rezeptor der Zielzelle bindet.

Derartige Wirkstoffe sind beispielsweise:

- 20 - Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF, EGF, TGF α , TGF β , KGF, SDGF, FGF, IGF, HGF, NGF, BDNF, Neurotrophine, BMF, Bombesin, M-CSF, Thrombopoietin, Erythropoietin, SCF, SDGF, Oncostatin, PDEGF, Endothelin-1
- Cytokine wie IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15
- 25 - Interferon α , β und γ
- Tumornekrosisfaktoren TNF α , - β
- Chemokine wie RANTES, MCAF, MIP-1 α oder - β , NAP, β -Thromboglobulin
- Peptidhormone wie SRH, SIH oder STH, MRH oder MSH, PRH, PIH oder
- 30 Prolaktin, LH-RH, FSH-RH, LH/ICSH oder FSH, TRH oder TSH, CRH oder ACTH
- Angiotensin, Kinine, Histamin, Homologe oder Analoge hiervon
- Steroidhormone wie Östrogene, Gestagene, Androgene, Glukokortikoide,

Mineralokortikoide, Homologe oder Analoge hiervon

- Vitamine wie z.B. Folsäure

- 5 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann der ZS-Ligand auch ein Adhäsionsmolekül, ein Teil des Adhäsionsmoleküls oder ein Analogon eines Adhäsionsmoleküls sein, welches an ein korrespondierendes zellmembranständiges Adhäsionsmolekül oder an eine andere spezifische Bindestruktur für ein Adhäsionsmolekül auf der Zielzelle bindet.
- 10 Derartige als ZS-Liganden funktionsfähige Adhäsionsmoleküle sind beispielsweise
- Lewis X (für GMP-140)
 - S-Lewis X (für ELAM-1).
 - LFA-1 (für ICAM-1 und ICAM-2)
 - 15 - MAC-1 (für ICAM-1)
 - VLA-4 (für VCAM-1)
 - PECAM (für PECAM)
 - Vitronectin (für den Vitronectinrezeptor)
 - GMP-140 (für Lewis X)
 - 20 - S-Lewis X (für ELAM-1)
 - ICAM-1, ICAM-2 (für LFA-1, MAC-1)
 - VCAM-1 (für VLA-4)
 - Fibronectin (für VLA-4)
 - Laminin (für VLA-6)
 - 25 - Fibronectin, Laminin (für VLA-1, VLA-2, VLA-3)
 - Fibronectin (für VLA-4)
 - Fibrinogen (für GPIIb-IIIa)
 - B7 (für CD28)
 - CD28 (für B7)
 - 30 - CD40 (für CD40L)
 - CD40L (für CD40)

Im Rahmen der vorliegenden Verbindung kann der ZS-Ligand auch der extrazelluläre Teil eines Fc-Rezeptors sein (Dougherty et al., Transfusion Science 17, 121 (1996)), an welchem ein Antikörper spezifisch für die Zielzelle über seinen Fc-Teil gebunden wird.

5

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann der ZS-Ligand auch ein Antikörpermolekül oder der epitopbindende Teil eines Antikörpermoleküls sein.

10

Die murinen monoklonalen Antikörper sind bevorzugt in humanisierter Form einzusetzen. Die Humanisierung erfolgt in der von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991) und Hoogenbooms et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)) dargestellten Weise. Antikörperfragmente werden entsprechend dem Stand der Technik hergestellt, beispielsweise in der von Winter et al., Nature 349, 293 (1991), Hoogenboom et al., Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993), Girol, Mol. Immunol. 28, 1379 (1991) oder Huston et al., Int. Rev. Immunol. 10, 195 (1993) beschriebenen Weise.

15

20

Rekombinante Antikörperfragmente werden direkt aus existierenden Hybridomen hergestellt oder werden mit Hilfe der "phage display"-Technologie (Smith, Science 228, 1315 (1985)) aus Bibliotheken muriner bzw. Humaner Antikörperfragmente isoliert (Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433 (1994)). Diese Antikörperfragmente werden dann auf genetischer Ebene direkt für weitere Manipulationen (z.B. der Fusion mit anderen Proteinen) eingesetzt.

25

30

Zur Herstellung von rekombinanten Antikörperfragmenten aus Hybridomen wird die genetische Information, die für die antigenbindenden Domänen (VH, VL) der Antikörper kodiert, durch Isolierung der mRNA, die reverse Transkription der RNA in cDNA und die anschließende Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., Science 230, 1350 (1985)) und Oligonukleotiden komplementär zu den 5'- bzw. 3'-Enden der variablen Fragmente (Orlandi et al., 1989) gewonnen. Die VH- und VL-Fragmente werden dann in bakterielle Expressionsvektoren z.B. in Form von Fv-Fragmenten (Skerra & Plückthun, Science 240, 1038 (1988)), einzelkettigen Fv-Fragmenten (scFv) (Bird et al., Science 242, 423 (1988)), Huston et al., PNAS-

USA 85, 5879 (1988)) oder als Fab-Fragmente (Better et al., Science 240, 1041 (1988)) kloniert.

5 Neue Antikörperfragmente können mittels der "phage-display"-Technologie auch direkt aus Antikörperbibliotheken (Immunbibliotheken, naive Bibliotheken) murinen oder humanen Ursprungs isoliert werden. Beim "phage display" von Antikörperfragmenten werden die antigenbindenden Domänen als Fusionsproteine mit dem Hüllprotein g3P filamentöser Bakteriophagen entweder in das Phagengenom (McCafferty et al., Nature 348, 552 (1990)) oder in Phagemid-Vektoren (Breitling et al., Gene 104, 147 (1991)) in Form von scFv-Fragmenten (MacCafferty et al. Nature 348, 552 (1990)) oder als Fab-Fragmente (Hoogenboom et al., Nucl. Acid Res. 19, 4133 (1991), Barbas et al., PNAS-USA 88, 7978 (1991)) kloniert. Antigen-bindende Phagen werden an antigenbeladenen Plastikgefäßen (panning) (Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)), an antigenkonjugierten, paramagnetischen "beads" (Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889 (1992)) oder durch Bindung an Zelloberflächen (Marks et al., Bio/Technol. 11, 1145 (1993)) selektioniert.

20 Immunbibliotheken werden hergestellt durch PCR-Amplifikation der variablen Antikörperfragmente aus B-Lymphozyten immunisierter Tiere (Sastry et al., PNAS-USA 86, 5728 (1989), Ward et al., Nature 341, 544 (1989), Clackson et al., Nature 352, 624 (1991)) oder Patienten (Mullinax et al., PNAS-USA 87, 8095 (1990), Barbas et al., PNAS-USA 88, 7978 (1991)). Dazu werden Kombinationen von Oligonukleotiden die spezifisch sind für murine (Orlandi et al., PNAS-USA 86, 3833 (1989), Sastry et al., PNAS-USA 86, 5728 (1989)) oder humane Immunglobulingene (Larrick et al., BBRC 160, 1250 (1989)) bzw. für die humanen Immunglobulin-Genfamilien (Marks et al. Eur. J. Immunol. 21, 985 (1991)) verwendet.

30 Unter Verwendung nichtimmunisierter Spender als Quelle der Immunglobulingene lassen sich naive Bibliotheken herstellen (Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581 (1991)). Alternativ können Immunglobulin-Keimbahngene zur Herstellung semisynthetischer Antikörperrepertoires eingesetzt werden, wobei die Komplementarität-bestimmende Region 3 der variablen Fragmente durch PCR mit

Hilfe degenerierter Primer ergänzt wird (Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227, 381 (1992), Barbas et al., PNAS-USA 89, 4457 (1992), Nissim et al., EMBO J. 13, 692 (1994), Griffiths et al., EMBO J. 13, 3245 (1994)). Diese sogenannten "single pot"-Bibliotheken haben gegenüber Immunbibliotheken den Vorteil, daß

5 Antikörperfragmente gegen eine Vielzahl von Antigenen aus einer einzigen Bibliothek isoliert werden können (Nissim et al., EMBO J. 13, 692 (1994)).

Die Affinität von Antikörperfragmenten kann mittels der "phage display"-Technologie weiter erhöht werden, wobei neu Bibliotheken von bereits existierenden

10 Antikörperfragmenten durch zufällige (Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889 (1992), Gram et al., PNAS-USA 89, 3576 (1992)), kodonbasierende (Glaser et al., J. Immunol. 149, 3903 (1992)) oder gezielte Mutagenese (Balint & Larrick, Gene 137, 109 (1993)), durch "chain shuffling" einzelner Domänen mit Fragmenten aus naiven Repertoires (Marks et al., Bio/Technol. 10, 779 (1992)) oder unter Zuhilfenahme von

15 bakteriellen Mutatorstämmen (Low et al., J. Mol. Biol. 260, 359 (1996)) hergestellt werden und durch Reselektion unter stringenten Bedingungen (Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889 (1992)) Antikörperfragmente mit verbesserten Eigenschaften isoliert werden. Zusätzlich können murine Antikörperfragmente durch stufenweisen Austausch einer der variablen Domänen gegen ein humanes Repertoire und

20 anschließende Selektion mit dem ursprünglichen Antigen ("guided selection") (Jespers et al., Bio/Technol. 12, 889 81994)) humanisiert werden. Alternativ erfolgt die Humanisierung muriner Antikörper durch zielgerichteten Austausch der hypervariablen Regionen humaner Antikörper durch die korrespondierenden Regionen des originalen murinen Antikörpers (Jones et al., Nature 321, 522 (1987)).

25 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann der ZS-Ligand auch das Hüllprotein oder ein Teil des Hüllproteins von Viren darstellen, welche über ihr Hüllprotein an ausgewählte Zellen spezifisch binden.

30 Die Wahl des ZS-Liganden richtet sich nach der Zielzelle, welche durch das Genkonstrukt transduziert werden soll.

Als Beispiele hierfür gelten:

ZS-Liganden für aktivierte Endothelzellen

5 Hierzu gehören im Sinne der Erfindung Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Membranstrukturen von Endothelzellen wie sie beispielsweise von Burrows et al. (Pharmac. Ther. 64, 155 (1994), Hughes et al. (Cancer Res. 49, 6214 (1989) und Maruyama et al. (PNAS-USA 87, 5744 (1990)) beschrieben wurden. Insbesondere zählen hierzu Antikörper gegen die VEGF-Rezeptoren.

10

Zu den ZS-Liganden gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Endothelzellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Substanzen, die endständig Mannose enthalten des weiteren IL-1 oder Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Endothelzellen binden, wie
15 beispielsweise PDGF, bFGF, VEGF, TGF β (Pusztain et al., J. Pathol. 169, 191 (1993)).

20

Des weiteren gehören hierzu Adhäsionsmoleküle, welche an aktivierte und/oder proliferierende Endothelzellen binden. Derartige Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise Slex, LFA-1, MAC-1, LECAM-1, VLA-4 oder Vitronectin wurden bereits beschrieben (Übersichten bei Augustin-Voss et al., J. Cell Biol. 119, 483 (1992), Pauli et al., Cancer Metast. Rev. 9, 175 (1990), Honn et al., Cancer Metast. Rev. 11, 353 (1992)).

25

Zu den ZS-Liganden im Sinne dieser Erfindung gehören insbesondere Glykoproteine der Hülle von Viren, die einen Tropismus für Endothelzellen haben. Zu diesen Viren gehören beispielsweise:

30

- Filoviren, beispielsweise
 - * das Marburg-Virus
 - mit seinem Hüllprotein GP (glycoprotein) und sGP (second glycoprotein)

oder das Ebola-Virus

- jeweils mit seinem Hüllprotein GP und sG

5 - das Cytomegalovirus
besonders mit seinem gB-Protein

- das Herpes Simplex-Virus Type I

- das HIV-1 Virus

10

- das Masern-Virus

- das Hantaan-Virus

15

- Alphaviren, wie Semliki Forest-Virus

- das Virus des epidemischen, haemorrhagischen Fiebers

- das Poliovirus

20

- Enteroviren (wie z.B. Echo 9, Echo 12, Cochsackie B3)

ZS-Liganden für aktivierte Makrophagen und/oder aktivierte Lymphozyten

25

Zu den Liganden im Sinne der Erfindung gehören des weiteren Substanzen, welche an die Oberfläche von Immunzellen spezifisch binden. Hierzu gehören Antikörper oder Antikörperfragmente gerichtet gegen Membranstrukturen von Immunzellen, wie sie beispielsweise von Powelson et al., Biotech. Adv. 11, 725 (1993) beschrieben wurden.

30

Des weiteren gehören zu den ZS-Liganden auch monoklonale oder polyklonale

Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihrem antigenbindenden variablen Teil an Fc- γ - oder Fc- ϵ - oder Fc- μ Rezeptoren von Immunzellen binden (Rojanasakul et al., Pharm. Res. 11, 1731 (1994)).

- 5 Des weiteren gehört hierzu das Fc-Fragment von humanem monoklonalem oder polyklonalem Immunglobulin. Derartige Fc-Fragmente werden beispielsweise gentechnisch mit Hilfe rekombinierter DNA oder entsprechend der Methoden von Haupt et al., Klin. Wschr. 47, 270 (1969), Kranz et al., Dev. Biol. Standard 44, 19 (1979); Fehr et al., Adv. Clin. Pharmac. 6, 64 (1974), Menninger et al.,
10 Immunochem. 13, 633 (1976) hergestellt.

Zu den ZS-Liganden gehören des weiteren alle Substanzen, welche an Membranrezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen binden. Hierzu gehören Zytokine wie beispielsweise IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , GM-CSF, M-CSF des
15 weiteren Wachstumsfaktoren wie beispielsweise EGF, TGF, FGF, IGF oder PDGF oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Immunzellen binden.

Hierzu gehören des weiteren Adhäsionsmoleküle und andere Liganden, welche an
20 Zellmembranstrukturen, wie beispielsweise an den Mannose 6-Phosphat-Rezeptor auf Makrophagen in Milz, Leber, Lunge und andere Gewebe binden.

Eine Auswahl dieser Liganden und Membranstrukturen sind übersichtlich bei Perales et al., Eur. J. Biochem. 226, 255 (1994) beschrieben.
25

Zu den ZS-Liganden im Sinne dieser Erfindung gehören jedoch auch Glykoproteine der Hülle von solchen Viren, die einen Tropismus für Lymphozyten und/oder Makrophagen haben.

30

Zu diesen Makrophagen infizierenden Viren gehören beispielsweise:

- HIV-1
besonders solche Stämme mit Mutationen in der V3-Region von gp120, die zu einer erhöhten Bindung an Makrophagen führen,
- HIV-2
- 5 - Hantaviren, beispielsweise des Puumalavirus
- Cytomegalovirus
- Respiratory Syncytial Virus
- Herpes simplex-Virus
- Filoviren.

10

Zu den Lymphozyten infizierenden Viren gehören beispielsweise:

- Varizella-Zoster-Virus (VZV);
VZV infiziert besonders T-Zellen
- 15 - Herpes Virus 6 (HHV-6);
HHV-6 infiziert besonders T-Zellen
- Rabies-Virus;
das Rabies-Virus Hüllprotein bindet besonders an TH2-Zellen
- HIV-1;
20 das Glykoprotein gp120 bindet bevorzugt an das CD4 Molekül von T-Zellen
- HTLV-II;
HTLV-II infiziert besonders B-Zellen
- HTLV-I;
HTLV-I infiziert besonders T-Zellen
- 25 - Influenza C-Viren;
Influenza-C-Viren binden über das Haemagglutinin-Esterase-Fusions-(HEF)-Protein an N-acetyl-9- β -acetylneuraminsäure (Neu 5,9 Ac), welche bevorzugt auf B-Lymphozyten, weniger oder nicht auf T-Lymphozyten vorkommt
- Influenza C-Viren mit Mutation in der Nukleotidposition 872 (die die Position 284 des HEF der Aminosäuresequenz kodiert), beispielsweise ein Austausch
30 des Threonins durch Isoleucin. Das Oberflächenprotein HEF mit dieser Mutation hat eine deutlich stärkere Affinität zum N-acetyl-9-O-acetylneuraminsäure-Rezeptor als das Wildvirus

- HEF Spaltprodukte des Influenza C-Virus, welche die Bindestruktur für N-acetyl-9- β -acetylneuraminsäure enthalten. Diese Bindestruktur ist definiert durch die katalytische Triade Serin-71, Histidin 368 oder - 369 und Arsparaginsäure 261

- 5
- Epstein-Barr Virus;
EBV infiziert besonders B-Zellen
 - Herpes simplex-Virus-2;
HSV-2 infiziert besonders T-Zellen
 - Masernvirus

10

ZS-Liganden für Muskelzellen

Hierzu gehören beispielsweise Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Membranstrukturen von Muskelzellen, insbesondere von glatten Muskelzellen. Derartige Antikörper sind beispielsweise

15

- der Antikörper 10F3
 - Antikörper gegen Actin
 - Antikörper gegen Angiotensin II-Rezeptoren
- oder
- Antikörper gegen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren

20

oder Antikörper gerichtet beispielsweise gegen

25

- EGF-Rezeptoren
- oder gegen PDGF-Rezeptoren
- oder gegen FGF-Rezeptoren
- oder Antikörper gegen Endothelin A-Rezeptoren.

30

Zu den ZS-Liganden gehören des weiteren alle Wirksubstanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Muskelzellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch glatte Muskelzellen binden wie

beispielsweise

- PDGF
- EGF
- 5 - TGF β
- TGF α
- FGF
- Endothelin A

10 Zu den ZS-Liganden im Sinne dieser Erfindung gehören jedoch auch Glykoproteine der Hülle von solchen Viren, die einen Tropismus für Muskelzellen haben. Zu diesen Viren gehört beispielsweise das Cytomegalovirus.

ZS-Liganden für blutbildende Zellen

15

Zu den ZS-Liganden gehören Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Rezeptoren exprimiert auf gering differenzierten Blutzellen.

20

Derartige Antikörper sind beispielsweise für folgende Rezeptoren beschrieben worden:

25

- Stem Cell Factor Receptor
- IL-1-Rezeptor (Type I)
- IL-1-Rezeptor (Type II)
- 25 - IL-3-Rezeptor α
- IL-3-Rezeptor β
- IL-6-Rezeptor
- GM-CSF-Rezeptor

30

Des weiteren gehören zu den ZS-Liganden auch monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren konstanten Domänen an Fc- γ Rezeptoren von Immunzellen binden.

5 Zu den ZS-Liganden gehören des weiteren alle Substanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf der Oberfläche von gering differenzierten Blutzellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren, wie SCF, IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Blutzellen binden.

ZS-Liganden für Synovialzellen und Entzündungszellen

10 Hierzu gehören monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren variablen Domänen an Membranstrukturen von Synovialzellen oder Entzündungszellen binden. Solche Membranstrukturen sind beispielsweise

- Vimentin
- Fibronectin
- 15 - Fc-Rezeptoren.

Hierzu gehören auch monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren konstanten Domänen an Fc-Rezeptor binden.

20 Hierzu gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Synovialzellen binden. Beispielsweise gehören hier Cytokine oder Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Synovialzellen binden wie beispielsweise IL-1-RA, $TNF\alpha$, IL-4, IL-6, IL-10, IGF, $TGF\beta$.

25 Desweiteren gehören hierzu ZS-Liganden, deren wesentlicher Bestandteil endständige Mannose ist, welche an Mannose-6-Phosphatrezeptoren auf Makrophagen bindet.

30 ZS-Liganden für mit Viren infizierte Zellen

Zu den ZS-Liganden gehören Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen die Virusantigene exprimiert auf der Zellmembran von virusinfizierten Zellen.

Derartige Antikörper sind beispielsweise für mit folgenden Viren infizierten Zellen beschrieben worden:

- HBV
- 5 - HCV
- HSV
- HPV
- HIV
- EBV
- 10 - HTLV.

ZS-Liganden für Leberzellen und weitere Gewebezellen

- 15 Zu den ZS-Liganden gehören alle Substanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf der Oberfläche von Leberzellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren, wie Zytokine, EGF, TGF, FGF oder PDGF, oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch derartige Zellen binden.
- 20 Hierzu gehören des weiteren ZS-Liganden, welche an Zellmembranstrukturen binden, welche selektiv sind für bestimmte Gewebe. Hierzu zählen beispielsweise:

Tabelle 1:

	Membranstruktur	ZS-Ligand	Gewebezellen
5	Asialoglycoprotein-Rezeptor	Asialoorosomucoid Neoglycoprotein Galactose	Leberzellen
	Transferrin-Rezeptor	Transferrin	Leber, andere Gewebezellen
	Insulin-Rezeptor	Insulin	Leber, andere Gewebezellen
	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor	Mannose	Makrophagen in Milz, Leber, Lunge, andere Gewebe
10	Fc-γ-Rezeptoren	Immunglobulin G	retikuloendotheliales System, andere Gewebe

Diese Liganden und Membranstrukturen sind übersichtlich bei Perales et al., Eur. J. Biochem. 226, 255 (1994) beschrieben.

15

Zu den ZS-Liganden im Sinne der Erfindung gehören jedoch besonders Glykoproteine der Hülle von Viren, die einen Tropismus für ausgewählte Zellen haben, wie beispielsweise für

20

- Bronchialepithelzellen
 - * Respiratory syncytial virus
- Leberzellen
 - * Hepatitis C-Virus
 - * Filoviren

25

- Leberzellen binden z.B. das Marburg-Virus über den Asialoglykoprotein-Rezeptor
 - * Hepatitis B-Virus
- Leberzellen binden bevorzugt über den Asialoglykoprotein-Rezeptor an der preS2 und preS1 Domäne von HBV

30

- * Hepatitis D-Virus

- lebersinusoidale Zellen
 - * Hepatitis V-Virus
 HBV wird gebunden über Fibronectin

5 ZS-Liganden für Gliazellen

10 Hierzu gehören Antikörper oder Antikörperfragmente gerichtet gegen Membranstrukturen von Gliazellen, wie sie beispielsweise von Mirsky et al., Coakham et al. und McKeever et al. berichtet wurden. Zu diesen Membranstrukturen gehören des weiteren Neuraladhäsionsmoleküle wie N-CAM, insbesondere dessen Polypeptidkette C.

15 Hierzu gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Gliazellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Substanzen, die endständig Mannose tragen und an den Mannose-6-Phosphatrezeptor binden, Insulin und Insulin-like growth factor, PDGF und diejenigen Fragmente dieser Wachstumsfaktoren, welche an die zugehörigen Membranrezeptoren binden.

20 Zu den ZS-Liganden im Sinne der Erfindung gehören insbesondere Iyko-Proteine der Hülle von solchen Viren, die einen Tropismus für Gliazellen haben.

Zu diesen Viren gehören beispielsweise:

- 25
- HIV-1 Subtyp JRF1
 - Herpes simplex-Virus I

ZS-Liganden für Leukämiezellen

30 Hierzu gehören Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Membranstrukturen von Leukämiezellen. Eine große Anzahl derartiger monoklonaler Antikörper sind bereits für diagnostische und therapeutische Verfahren beschrieben worden (Übersichten bei Kristensen, Danish Medical Bulletin

41, 52 (1994); Schranz, Therapia Hungarica 38, 3 (1990); Drexler et al., Leuk. Res. 10, 279 (1986); Naeim, Dis. Markers 7, 1 (1989); Stickney et al., Curr. Opin. Oncol. 4, 847 (1992); Drexler et al., Blut 57, 327 (1988); Freedman et al., Cancer Invest. 9, 69 (1991)). Je nach Typ der Leukämie sind als Liganden beispielsweise folgende monoklonalen Antikörper oder deren antigenbindende Antikörperfragmente geeignet:

Tabelle 3

<u>Zellen</u>	<u>Membranantigen</u>
AML	CD13
	CD14
	CD15
	CD33
	CAMAL
B-CLL	Sialosyl-Le
	CD5
	CD1c
	CD23
	Idiotypen und Isotypen der Membranimmungoglobuline
T-CLL	CD33
	M38
	IL-2-Rezeptoren
	T-Zell-Rezeptoren
ALL	CALLA
	CD19
	Non-Hodgkin
	Lymphoma

Zu den ZS-Liganden gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren von Leukämiezellen binden.

Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Leukämiezellen binden.

Derartige Wachstumsfaktoren wurden bereits beschrieben (Übersichten bei Cross et al., Cell 64, 271 (1991); Aulitzky et al., Drugs 48, 667 (1994); Moore, Clin. Cancer Res. 1, 3 (1995); Van Kooten et al., Leuk. Lymph. 12, 27 (1993)). Beispielsweise gehören zu ihnen:

- IFN α bei Non-Hodgkin Lymphomen
- IL-2, besonders bei T-Zell-Leukämien
- FGF bei T-Zell-, monozytären, myeloiden, erythroiden und megakaryoblastischen Leukämien
- TGF β bei Leukämien
- Retinoide, z.B. "Retinoic acid" bei akuter promyelozytärer Leukämie

ZS-Liganden für Tumorzellen

Hierzu gehören Antikörper und Fragmente dieser Antikörper, gerichtet gegen Membranstrukturen auf Tumorzellen. Derartige Antikörper wurden zum Beispiel von Sedlacek et al., Contrib. to Oncol. 32, Karger Verlag, München (1988) und Contrib. to Oncol. 43, Karger Verlag, München (1992) übersichtlich dargestellt.

Weitere Beispiele stellen dar Antikörper gegen:

- Sialyl Lewis
- Peptide auf Tumoren, welche von T-Zellen erkannt werden
- von Onkogenen exprimierte Proteine
- Ganglioside wie GD3, GD2, GM2, 9-O-acetyl GD3, Fucosyl GM1
- Blutgruppenantigene und deren Vorläufer
- Antigene auf dem polymorphen epithelialen Mucin
- Antigene auf Heat Shock Proteinen

Beschreibung des Linkers

Die Wahl des Linkers richtet sich nach der chemischen Natur des ZS-Liganden und des GS-Liganden und nach der Methode, mit welcher ZS-Ligand und GS-Ligand über den Linker miteinander verbunden werden.

- Sind die Liganden Peptide oder Proteine, so wird vorzugsweise ein Peptid oder Protein als Linker verwendet und die Verbindung des Linkers mit dem ZS-Liganden und dem GS-Liganden erfolgt vorzugsweise über eine Peptidbindung. Derartige ZS-Ligand-Linker-GS-Ligand oder ZS-Ligand-GS-Ligand-Linker Moleküle werden vorzugsweise als Fusionsproteine mit Hilfe der rekombinierten DNA-Technologie hergestellt.
- Ist der ZS-Ligand kein Peptid oder Protein, so stellt der Linker in seiner einfachsten Form eine Struktur dar, welche den ZS-Liganden mit dem GS-Liganden verbindet. Derartige Strukturen resultieren aus den verschiedenen chemischen Konjugationsmethoden, mit Hilfe derer Moleküle an Aminogruppen, Hydroxygruppen, SH-Gruppen, Carboxylgruppen oder an Aldehydgruppen in Proteinen gebunden werden (Übersicht der Methoden siehe Sedlacek et al., Contrib. to Oncol. 32, 42-49 und 81-85, Karger Verlag, München (1988).

Der Linker und der GS-Ligand können jedoch auch selbst jeweils ein Peptid oder Protein sein. In diese Falle erfolgt die Verbindung zwischen beiden vorzugsweise über eine Peptidbindung und zum Linker über eine der chemischen Konjugationsmethoden. Dieses gilt insbesondere bei der Ausführungsform c) der Erfindung.

Die Wahl des Linkers richtet sich jedoch auch nach der Art des durch den GS-Liganden gebundenen Genkonstruktes.

- Ist das Genkonstrukt eine nackte RNA oder eine nackte DNA alleine oder im Komplex mit einem nichtviralen Träger, ist der Linker vorzugsweise ein

Molekül mit fusiogener Eigenschaft. Diese fusiogene Eigenschaft erleichtert die Passage des Genkonstruktes durch die Zellmembran und aus den Lysosomen in das Zytoplasma.

- Ist das Genkonstrukt ein Virus, so kann als Linker ein Molekül mit fusiogener Eigenschaft gewählt werden. Im Sinne dieser Erfindung ist vorzugsweise ein Linker mit fusiogener Eigenschaft zu verwenden.

Durch diese fusiogene Eigenschaft des Linkers wird eine Beeinträchtigung der fusiogenen Eigenschaft der Hüllproteine des Virus durch die Bindung des GS-Liganden an das Virus kompensiert oder die fusiogene Eigenschaft der Hüllproteine des Virus verstärkt.

Im Sinne dieser Erfindung werden als Linker mit fusiogener Eigenschaft virale oder bakterielle Peptide oder Proteine wie auch synthetische Peptide (zum Beispiel solche, welche im sauren Milieu des Endosomes α -Helices bilden) verwendet.

Moleküle mit fusiogener Eigenschaft sind beispielsweise:

- * Peptide enthaltend die Translokationsdomäne (Domäne II) des Exotoxins A von *Pseudomonas*
(Wels et al., Cancer Res. 52, 6310 (1992); Fominaga et al., J. Biol. Chem. 271, 10560 (1996))
- * Peptide enthaltend das Peptid
GLFEALLELLESLWELLLEA
(Gottschalk et al., Gene Ther. 3, 448 (1996))
- * Peptide enthaltend das Peptid
AALAEA[LAEA]₄LAAAAGC (Acm)
(Wang et al., Technol Advances in Vector Syst. For Gene Ther., May 6-7, 1996, Coronado, IBC Conference)
- * Peptide enthaltend das Peptid
FAGV-VLAGAALGVAAAQI
des Fusionsproteins des Masern-Virus Yeagle et al., Biochem. Biophys. Acta

1065, 49 (1991))

- * Peptide enthaltend das Peptid

GLFGAIAGFIEGGWWGMIDG

des HA2 Proteins von Influenza A (Lüneberg et al., J. Biol. Chem. 270, 27606 (1995))

- * Peptide enthalten das Peptid

GLFGAIAGFIENGWEGMIDGGLFGAIAGFIENGWEGMIDG

(Burger et al., Biochem. 30, 11173 (1991) oder das Peptid

GLFGAIAGFIE;

ALFGAIAGFIE;

LFLGAIAGFIE;

LLLGAIAGFIE;

LILGAIAGFIE;

GIFGAIAGFIE;

GLLGAIAAGFIE;

GLFAAIAGFIE;

GLFEAIAGFIE;

GLFGAMAGFIIE;

GLFGAIAGLIE oder das Peptid

GLFGAIAGFIV

(Steinhauer et al., J. Virol. 69, 6643 (1995))

oder das Peptid

GLFEAIAEFIEGGWEGLIEG

oder das Peptid

GLLEALAELEGGWEGLLEG

(Ishiguro et al., Biochem. 32, 9792 (1993)).

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden desweiteren Proteine von Viren verwendet, welche fusiogene Eigenschaften haben. Eine Reihe von Viren besitzt fusiogene Hüllproteine, so beispielsweise Paramyxoviren, Retroviren und Herpesviren (Gaudin et al., J. Gen. Virol. 76, 1541 (1995)).

Eine Reihe von Viren besitzen des weiteren Glykoproteine, die verantwortlich sind sowohl für die Virusanheftung als auch nachfolgend die Zellmembranfusion (Gaudin et al., J. Gen. Viro. 76, 1541 (1995)).

Derartige Proteine werden beispielsweise von Alpha-, Rhabdo- und Orthomyxoviren gebildet.

Virale fusiogene Proteine im Sinne der Erfindung wurden übersichtlich beschrieben von Hughson, Curr. Biol. 5, 265 (1995); Hoekstra, J. Bioenergetics Biomembranes 22, 675 (1990); White, Ann. Rev. Physiol. 52, 675 (1990)).

Fusiogene Proteine im Sinne dieser Erfindung sind beispielsweise:

- das Haemagglutinin von Influenza A- oder B-Viren, insbesondere die HA2-Komponente
- das M2-Protein von Influenza A-Viren
alleine oder in Kombination (Ohuchi et al., J. Virol. 68, 920 (1994)) mit dem Haemagglutinin von Influenza eingesetzt oder mit Mutanten von Neuraminidase von Influenza A, denen die Enzymaktivität fehlt, die jedoch Haemagglutination bewirken
- Peptidanaloga des Influenza-Virus Haemagglutinins
- das HEF-Protein des Influenza C-Virus
Die Fusionsaktivität des HEF-Proteins wird aktiviert durch Spaltung des HEFo in die Untereinheiten HEF1 und HEF2
 - das Transmembranglykoprotein von Filoviren, wie beispielsweise
 - * des Marburg-Virus
 - * des Ebola-Virus
- das Transmembranglykoprotein des Tollwutvirus
- das Transmembranglykoprotein (G) des Vesicular Stomatitis-Virus
- das Fusionsprotein des HIV-Virus, insbesondere die gp41-Komponente und fusiogene Komponenten hiervon
- das Fusionsprotein des Sendai-Virus, insbesondere die aminoterminalen 33 Aminosäuren der F1-Komponente

- das Transmembranglykoprotein des Semliki Forest-Virus, insbesondere die E1-Komponente
- das Transmembranglykoprotein des Tickborn Enzephalitis-Virus
- das Fusionsprotein des menschlichen respiratorischen syncytialen Virus (RSV) (im besonderen die gp37-Komponente)
- das Fusionsprotein (S-Protein) des Hepatitis B-Virus
- das Fusionsprotein des Masern-Virus
- das Fusionsprotein des Newcastle Disease Virus
- das Fusionsprotein des Visna-Virus
- das Fusionsprotein vom murinen Leukämie-Virus (im besonderen p15E)
- das Fusionsprotein vom HTL-Virus (im besonderen das gp21)
- das Fusionsprotein des Simian Immunodeficiency Virus (SIV)

Virale fusiogene Proteine werden entweder durch Lösung der Hüllproteine aus einer Virusanreicherung mit Hilfe von Detergentien (wie beispielsweise β -D-octylglucopyranosid) und Abtrennung durch Zentrifugation (Übersicht bei Mannio et al., Bio-Techniques 6, 682 (1988)) gewonnen oder aber mit Hilfe von dem Fachmann bekannten molekularbiologischen Methoden. Beispiele für die Herstellung von fusiogenen Proteinen wurden beispielsweise beschrieben für

- das Influenza-Haemagglutinin
- fusiogene Fragmente des Influenza-Haemagglutinins
- das M2-Protein von Influenza V
- das HEF-Protein von Influenza C
- das Transmembranglykoprotein von Filoviren, wie beispielsweise
 - * das Marburg-Virus
 - * das Ebola-Virus
- das Transmembranglykoprotein des Tollwutvirus
- das Transmembranglykoprotein des Vesicular Stomatitis-Virus
- das Transmembranglykoprotein des Semliki Forest-Virus
- das Transmembranglykoprotein des Tickborn Enzephalitis-Virus
- das Transmembranglykoprotein des HIV-1-Virus

Beschreibung des genkonstruktsspezifischen Liganden (GS-Ligand)

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung stellt der GS-Ligand eine Struktur dar, welche direkt oder indirekt an das Genkonstrukt bindet. Bevorzugterweise stellt der GS-Ligand ein ganzes Antikörpermolekül oder ein Epitop-bindendes Fragment eines Antikörpers dar.

Die murinen monoklonalen Antikörper sind bevorzugt in humanisierter Form einzusetzen. Die Humanisierung erfolgt, wie bereits im Abschnitt "Beschreibung des ZS-Liganden" beschrieben, in der von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991)) und Hoogenboom et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemöbiol. 36, 19 (1993)) dargestellten Weise. Antikörperfragmente und rekombinante Fv-Fragmente werden entsprechend dem Stand der Technik, und wie bereits im Abschnitt "Beschreibung des ZS-Liganden" beschrieben, hergestellt.

Ob ein bivalentes oder ein monovalentes Fragment Verwendung findet, ist von der Wahl der Antikörperspezifität und des Genkonstruktes abhängig. Wenn der gewählte Antikörper die Fusionsaktivität des Hüllproteins eines viralen Genkonstruktes beeinträchtigt (wie z.B. von Ubol et al., J. Virol. 69 1990 (1995) beschrieben), so ist ein monovalentes Antikörperfragment zu bevorzugen.

Die Spezifität des Antikörpers richtet sich nach der Art des verwendeten Genkonstruktes.

- Ist das Genkonstrukt ein nackte RNA oder eine nackte DNA alleine oder im Komplex mit einem nichtviralen Träger, so ist eine der erfindungsgemäßen Ausführungsformen dieser Erfindung, daß die Spezifität des Antikörpers gerichtet ist gegen solche Epitope, welche in die DNA eingeführt wurden.

Derartige Epitope können erzeugt werden durch Bindung von xenogenen Substanzen an die DNA. Beispiele hierfür sind

- * Kreuzvernetzungen der DNA durch Cisplatin

- * Alkylierung am N⁷ von Guanin durch Alkylantien wie Nitrogen-Mustard, Melphalan, Chlorambucil
- * Interkalation in die Doppelhelix der DNA von Anthracyclinen wie Doxorubicin, Daunomycin

Monoklonale Antikörper gegen derartige neu eingeführte Epitope auf der DNA sind beispielsweise:

- Antikörper gegen methylierte DNA
- Antikörper gegen O⁶-ethyl deoxyguanosin (nach Behandlung der DNA mit Ethylnitrosohamstoff)
- Antikörper gegen N⁷-ethylguanin
- Antikörper gegen N⁵-methyl-N5 formyl-2,5,6 triamino 4-hydroxy pyrimidine
- Antikörper gegen
 - O⁶-methyl-2'-deoxyguanosin
 - O⁶-ethyl-2'-deoxyguanosin
 - O⁶-n-butyl-2'-deoxyguanosin
 - O⁶-isopropyl-2'-deoxyguanosin
 - O⁴-methyl-2'-deoxythymidin
 - O⁴-ethyl-2'-deoxythymidin
- Antikörper gegen Melphalan Adukte mit DNA
- Antikörper gegen Anthracycline

Neue Epitope in die DNA entstehen jedoch auch durch Methylierung der DNA im Rahmen des DNA-Stoffwechsels.

Von einer Reihe von E. coli Stämmen ist bekannt, daß sie die DNA der in sie eingeführten Plasmide am N⁶ des Adenins methylieren (Winnacker, From Genes to Clones, page 18/19, VCH Publisher, Weinheim (1987)). Bakterien besitzen das Enzym DNA-Adenin-Methylase, das während der Replikation spezifisch Adenine an der N⁶-Position methyliert (Hattman et al., J. Mol. Biol. 126, 367 (1978)).

Ein besonderer Gegenstand dieser Erfindung ist somit die Verwendung vom monoklonalen Antikörpern gegen methylierte DNA - im besonderen gegen methyliertes N⁶ des Adenins - im erfindungsgemäßen Ligandensystem.

- Ist das Genkonstrukt in Komplex mit einem nichtviralen Träger, so ist eine weitere besondere Ausführungsform dieser Erfindung, daß die Spezifität des Antikörpers gerichtet ist gegen ein Epitop auf dem Träger.

Zu diesen Trägern gehören kationische Polymere, Peptide, Proteine, Polyamine oder kationische Lipide wie beispielsweise kationische Lipide und Phospholipide. Beispiele für Antikörper gegen derartige Träger sind

- * Antikörper gegen Spermidin, Spermin oder Putrescin
 - * Antikörper gegen Polylysin
 - * Antikörper gegen Albumin
 - * Antikörper gegen Phospholipid
- Ist das Genkonstrukt ein Virus, so ist die Spezifität des Antikörpers gerichtet gegen ein oder mehrere gleiche oder unterschiedliche Epitope auf den Hüllproteinen des Virus. Da der Linker im verwendeten Ligandensystem bevorzugterweise ein fusiogenes Peptid oder Protein darstellt, können auch Antikörper verwendet werden, welche durch Bindung an das Hüllprotein die Zelladhäsion und/oder die fusiogene Aktivität des Virus beeinträchtigen.

Antikörper gegen Hüllproteine von Viren, die als Vektoren Verwendung finden können, sind beispielsweise Antikörper gegen das

- * murine Leukämie Virus
im besonderen Antikörper gerichtet gegen die Hüllproteine gp70 und p15
- * HIV-Virus
- * Adenovirus
- * Herpes Simplex Virus
im besonderen Antikörper gerichtet gegen das Glykoprotein B, Glykoprotein

H, Glykoprotein L und Glykoprotein D

- * Cytomegalovirus
im besonderen Antikörper gerichtet gegen das Glykoprotein B (gpB)
- * Minute Virus of mice
- * adenoassoziiertes Virus
im besonderen Antikörper gerichtet gegen Cap- und Rep-Proteine
- * Sindbis-Virus
im besonderen Antikörper gerichtet gegen das envelope protein E2 oder E
- * Vaccinia Virus

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt der GS-Ligand den zellexternen Teil eines Fc-Rezeptors dar. An diesen Fc-Rezeptor bindet über sein Fc-Teil einer der bereits erwähnten Antikörper, welcher mit seinem antigenbindenden Teil direkt oder indirekt an das Genkonstrukt bindet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt der GS-Ligand eine kationische Struktureinheit, wie beispielsweise eine kationische Aminosäure, ein kationisches Peptid oder Protein oder ein biogenes Amin dar, welche mit dem Genkonstrukt komplexieren können.

Zu diesen kationischen Struktureinheiten gehören beispielsweise:

- Lysin oder Polylysin
- Arginin oder Polyarginine
- Histidin oder Polyhistidine
- Peptide enthaltend mindestens 1 Lysin, 1 Arginin und/oder 1 Histidin
- Polyamine wie beispielsweise Cadaverin, Spermidin, Spermin, Agmatin oder Putrescin

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt der GS-Ligand den Rezeptor für das Hüllprotein des das Transgen beherbergenden Virus dar.

Derartige Rezeptoren sind beispielsweise für folgende Viren beschrieben worden:

- HIV
 - * das CD4-Molekül (löslich oder nativ)
 - * Galactosylceramid
- HBV
 - * der IL-6 Rezeptor
oder
 - * Annexin oder Apolipoprotein
- HTLV
 - * der IL-2 Rezeptor (die β - wie auch die γ -Kette)
- Masern Virus
 - * das CD46 Molekül
- Friend Leukemia Virus
 - * der Erythropoietin Rezeptor
- Varizella Zoster
 - * das Fc-Fragment von humanem Immunglobulin G
- Sendai Virus
 - * das Glycophorin
- Influenza C-Virus
 - * die N-acetyl-9-acetamido-9-deoxy-neuraminsäure
 - * die 9-O-acetyl-N-acetyl-neuraminsäure
- Foot and Mouth Disease Virus
 - * das integrin $\alpha V\beta 3$

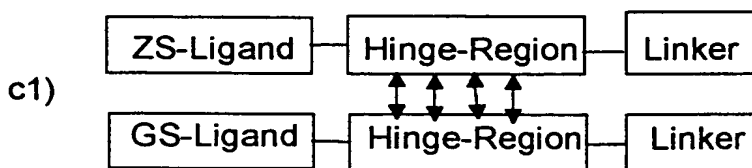
- EBV
 - * der Complement Rezeptor 2 (CD21)
- Herpes simplex Virus
 - * der 275-kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor oder der 46-kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor

Beschreibung des Verbindungsteiles

Das Verbindungsteil im Sinne der besonderen Ausführungsform c) der Erfindung sind mindestens zwei Moleküle, welche sich miteinander verbinden und welche zugleich jeweils mit einem gleichen oder unterschiedlichen Linker einerseits und dem ZS-Liganden oder dem GS-Liganden andererseits verbunden sind.

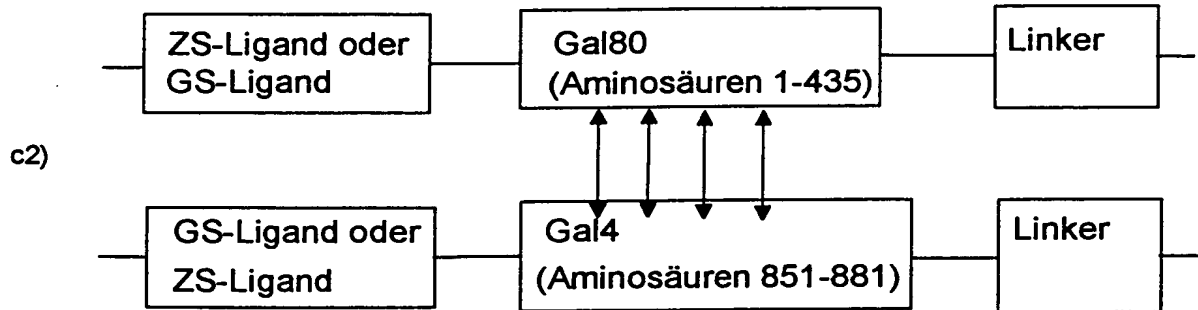
Ein bevorzugtes Beispiel eines solchen Verbindungsteiles ist die Hinge-Region eines Antikörpers, über welche die zwei schweren Ketten des Antikörpers miteinander verbunden sind (Burbon, TIBS 15, 64, 1990); Oi et al., Nature 307, 136 (1984); Alt et al., Science 238, 1079 (1987); Lorenz, Diplomarbeit: Konstruktion und Expression von rek. Antikörper-Enzym-Hybridmolekülen für die Tumorthherapie, Fakultät Humanmedizin, Universität Marburg (1991)).

Die erfindungsgemäße Anordnung der Hinge-Region ist beispielsweise im Schema c1) wiedergegeben.



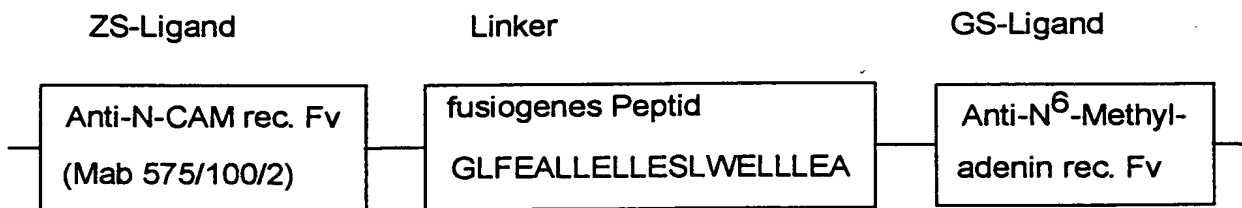
Die Verknüpfung der Hinge-Region mit den Linkern und mit dem GS- und ZS-Liganden erfolgt vorzugsweise über Peptidbindungen in der Form eines Fusionsproteins, hergestellt mit den Techniken der Rekombination von DNA.

Ein weiteres Beispiel für ein Verbindungsteil ist das Gal80-Protein (Leuther et al., Science 256, 1333 (1992)) in Kombination mit der Gal80-Bindungsdomäne von Gal4 (Leuther et al., Science 256, 1333 (1992)) entsprechend dem Schema c2).



Beispiel zur Erläuterung der Erfindung

Konstruktion des mehrfach funktionellen Ligandensystems



1. Herstellung des ZS-Liganden

Als Ausgangsmaterial für den ZS-Liganden dient das Hybridom des anti-NCAM monoklonalen Antikörpers 575/100/2 (Jaques et al., Cancer 72, 418 (1993)). Etwa 10^7 Zellen dieses Hybridoms werden abzentrifugiert und die mRNA wird aus diesen Zellen unter Zuhilfenahme des mRNA-Extraktionskits (Firma Pharmacia) extrahiert. Diese mRNA wird dann durch reverse Transkription unter Zuhilfenahme eines cDNA-Synthese-Kits und "random" Hexaoligonukleotiden (Firma Pharmacia) in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA dient als Ausgangsmaterial, um mit Hilfe von

spezifischen Primern (Clackson et al., Nature 352, 624 (1991)) die variable schwere Kette bzw. die variable leichte Kette der Immunglobuline mittels Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., Science 230, 1350 (1985)) zu amplifizieren. Durch die Primer werden gleichzeitig Restriktionsschnittstellen eingeführt, um die Fragmente in den bakteriellen Expressionsvektor pHENIS (der sich von pHEN1 ableitet; Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res. 19, 4133 (1991); siehe Abb. 1) zu klonieren. Er enthält eine pelB-Signalsequenz für die periplasmatische Sekretion, ein myc-tag für die Detektion mit dem monoklonalen Antikörper 9E10, ein Histidintag für die Reinigung mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) sowie eine Klonierungsregion für die schwere und leichte Kette und eine kurze Sequenz, die für einen 14 Aminosäure-langen Glycin-Serin-Linker kodiert. Ferner erfolgt die Fusion mit dem g3ß-Protein für das "display" an der Oberfläche von Bakteriophagen. Die schwere und leichte Kette werden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (VH mit SfiI und SmaI; VL mit ApaI und NotI) verdaut und nacheinander in den Vektor kloniert. Dadurch entsteht ein rekombinantes einzelkettiges Fv-Fragment bestehend aus der variablen schweren Kette und leichten Kette, die durch eine kurze Peptidsequenz kovalent verbunden sind.

2. Herstellung des GS-Liganden

Rekombinante Antikörper mit Spezifität für N⁶-Methyladenin (Fa. Sigma) werden aus naiven bzw. Semi-synthetischen Antikörperbibliotheken (Nissim et al., EMBO J. 13, 692 (1994)) wie beschrieben durch Biopanning an N⁶-Methyladenin-BSA bzw. -Thyroglobulin-Konjugaten (Beiser et al., Method Enzymol. XII, 889 (1968)) selektioniert. Die Identifizierung positiver Antikörperfragmente erfolgt durch ELISA in antigenbeschichteten Mikrotiterplatten (Nissim et al., EMBO J. 13, 692 (1994)). Antikörper aus diesen Bibliotheken sind bereits in dem gewünschten einzelkettigen Fv-Format und können direkt für weitere Klonierungen eingesetzt werden.

3. Herstellung des Linkers

Als Linker dient ein fusiogenes Peptid mit der Aminosäuresequenz GLFEALLEL-LESLWELLLEA (Gottschalk et al., 1996). Die codierende DNA für dieses Peptid

wird als doppelsträngiges, synthetisches Oligonukleotid hergestellt, wobei an den Enden geeignete Restriktionsschnittstellen (Ascl und Xbal) angehängt werden.

Dafür werden die zwei synthetischen Oligonukleotide O1

(5'GGCCGCAGGCTTATTTGAGGCCCTTCTGGAATTGCTAGAGAGCCTCTGGGA
ATTGCTTCTGGAGGCAT, SEQ ID No.:1)

und O2

(5'CTAGATGCCTCCAGAAGCAATTCCCAGAGGCTCTCTAGCAATTCCAGAAGGG
CCTCAAATAAGCCTG, SEQ ID No.: 2) mit T4 Polynukleotidkinase (Firma Gibco)

entsprechend den Angaben des Herstellers phosphoryliert, für 5 min. auf 80° C erwärmt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Dieses doppelsträngige DNA-Fragment wird direkt für weitere Klonierungen verwendet.

4. Herstellung des mehrfach funktionellen Liganden

Das komplette Ligandensystem wird in den Expressionsvektor pAB1 (der ähnlich wie PHENIS aufgebaut ist, jedoch keine Fusion mit g3p aufweist; siehe Abb. 1) in Form einer 3-Fragment-Klonierung hergestellt. Als Ausgangsmaterial dienen das anti-NCAM einzelkettige Fv-Fragment (ZS-Ligand), welches mit den Restriktionsenzymen SfiI und NotI geschnitten wurde, der Linker, welcher die Klonierungsstellen NotI und XbaI enthält, und das anti-N⁶-Methyladenin einzelkettige Fv-Fragment (GS-Ligand). Für die Klonierung wird das GS-Fragment mit Primern reamplifiziert, die am N- und C-Terminus die Restriktionsschnittstellen XbaI bzw. Ascl einfügen. Diese Fragmente werden in den mit den Restriktionsenzymen SfiI und Ascl geschnittenen pAB1-Vektor kloniert. Das Konstrukt wird in dem Bakterienstamm TG1 transformiert. Die Regulation der Expression des Ligandensystems erfolgt über den bakteriellen lacZ-Promotor und wird durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) induziert (wie beschrieben in McCafferty et al., Appl. Biochem. Biotech. 47, 157 (1994)). Das exprimierte Protein wird aus periplasmatischen Präparationen mittels IMAC nach der Methode von Griffiths et al., EMBO J. 13, 3245 (1994) aufgereinigt. Das Gesamtprotein besitzt ein Molekulargewicht von ca. 55.000 Dal und liegt als Monomer vor.

5. Funktionsprüfung des mehrfach funktionellen Liganden

NCAM exprimierende Tumorzellen (kleinzelliges Bronchialkarzinom) werden in der Zellkultur mit der dem Fachmann bekannten Zellkulturtechnik vermehrt und isoliert. Am N⁶ des Adenins methylierte DNA wird durch Vermehrung eines Plasmids (enthaltend das Strukturgen β -glucuronidase, siehe Patentanmeldung EP95.03370) in *E. coli* hergestellt.

Das mehrfach funktionelle Ligandensystem wird mit der Plasmid DNA im molaren Verhältnis von 20:1 vermischt und für 30 min. bei 37° C inkubiert. Die Bindung an die Plasmid DNA wird mittels ELISA überprüft. Der Komplex aus dem mehrfach funktionellen Liganden und dem Plasmid wird mit den Tumorzellen im Verhältnis 10:1 vermischt und bei 37° C für 1 Stunde inkubiert. Ein Teil der Tumorzellen wird gewaschen. An diese Tumorzellen wird die Bindung der Komplexe mit Hilfe der Immunfluoreszenz überprüft. Die übrigen Tumorzellen werden weitere 24 Stunden inkubiert. Die erfolgreiche Aufnahme der Komplexe in die Zelle, die Linker-vermittelte Freisetzung aus den Endosomen, die Transkription und die Expression des Effektorgens wird durch den Nachweis der enzymatischen Aktivität der β -Glucuronidase im Kulturmedium mit Hilfe von 4-Methylumbelliferyl- β -glucuronid als Substrat bestimmt.

Patentansprüche:

1. Mehrfach funktionelles Ligandensystem zur zielzellspezifischen Übertragung von Nukleotidsequenzen bestehend aus mindestens einem zielzellspezifischen Liganden, mindestens einem Linker und mindestens einem genkonstruktsspezifischen Liganden, wobei der genkonstruktsspezifische Ligand einen direkt oder indirekt an das Genkonstrukt bindenden Antikörper oder einen Teil davon enthält.
2. Ligandensystem nach Anspruch 1 ergänzt um ein Verbindungsteil, welches aus mindestens zwei miteinander verbundenen Komponenten besteht, an welche wiederum mindestens 1 Linker, mindestens 1 genkonstruktsspezifischer Ligand und mindestens 1 zielzellspezifischer Ligand gekoppelt sind.
3. Ligandensystem nach einem der vorhergegangenen Ansprüche, bei welchem der zielzellspezifische Ligand an die Oberfläche einer Zielzelle bindet.
4. Ligandensystem nach Anspruch 3, bei welchem der zielzellspezifische Ligand ein Wachstumsfaktor, ein Zytokin, ein Interferon, ein Tumornekrosefaktor, ein Chemokin, ein peptidhormon, ein Angiotensin, ein Kinin, ein Histamin, ein Steroidhormon, ein Adhäsionsmolekül oder ein Vitamin darstellt oder aber eine an die Zielzelle bindende Teilsequenz oder ein Homolog oder ein Analog dieser Stoffe darstellt.
5. Ligandensystem nach Anspruch 3, bei welchem der zielzellspezifische Ligand ein Antikörper oder eine an die Zielzelle bindende Teilsequenz des Antikörpers darstellt.
6. Ligandensystem nach Anspruch 5, bei welchem die Teilsequenz ein F(ab)₂-Fragment, ein Fab-Fragment, ein doppelkettiges Fv-Fragment, ein einzelkettiges Fv-Fragment oder ein Fc-Fragment darstellt.
7. Ligandensystem nach einem der Ansprüche 2 oder 3, bei welchem der

zellspezifische Ligand der zellexterne Teil eines Fc-Rezeptors ist, an welchen ein Antikörper spezifisch für die Zielzelle über seinen Fc-Teil gebunden ist.

8. Ligandensystem nach einem der Ansprüche 4 - 7, bei welchem der Antikörper oder die an die Zielzelle bindende Teilsequenz des Antikörpers vollständig oder teilweise humanen Ursprungs ist.
9. Ligandensystem nach einem der Ansprüche 2 oder 3, bei welchem der genkonstruktsspezifische Ligand darstellt
 - einen direkt oder indirekt an das Genkonstrukt bindenden Antikörper
 - eine direkt oder indirekt an das Genkonstrukt bindende Teilsequenz des Antikörpers
 - eine kationische Struktureinheit oder
 - eine Struktureinheit, an welche das Hüllprotein eines das Genkonstrukt enthaltenden Virus bindet.
10. Ligandensystem nach Anspruch 9, bei welchem die Teilsequenz des Antikörpers ein F(ab)₂-Fragment, ein Fab-Fragment, ein doppelkettiges Fv-Fragment oder ein einzelkettiges Fv-Fragment darstellt.
11. Ligandensystem nach einem der Ansprüche 2 oder 3, bei welchem der genkonstruktsspezifische Ligand der zellexterne Teil eines Fc-Rezeptors ist, an welchen ein für das Genkonstrukt spezifischer Antikörper über sein Fc-Teil gebunden ist.
12. Ligandensystem nach einem der Ansprüche 9 bis 11, bei welchem der direkt oder indirekt an das Genkonstrukt bindende Antikörper oder die direkt oder indirekt an das Genkonstrukt bindende Teilsequenz des Antikörpers vollständig oder teilweise humanen Ursprungs ist.
13. Ligandensystem nach einem der Ansprüche 9 - 12, bei welchem der Antikörper oder die Teilsequenz des Antikörpers spezifisch bindet an

Epitope, welche durch Bindung von xenogenen Substanzen an die RNA oder DNA, durch Methylierung oder durch Alkylierung der DNA oder RNA eingeführt wurden.

14. Ligandensystem nach einem der Ansprüche 9 - 12, bei welchem der Antikörper oder die Teilsequenz des Antikörpers spezifisch bindet an ein Epitop auf einem nichtviralen Träger, welcher mit dem Genkonstrukt komplexiert.
15. Ligandensystem nach Anspruch 14, bei welchem der nichtvirale Träger ein kationisches Polymer, Peptid, Protein, biogenes Amin, Polyamin, Lipid oder Phospholipid ist.
16. Ligandensystem nach einem der Ansprüche 9 bis 12, bei welchem der Antikörper oder die Teilsequenz des Antikörpers spezifisch bindet an ein Epitop auf dem Hüllprotein eines Virus.
17. Ligandensystem nach Anspruch 16, bei welchem das Virus ein murines Leukämievirus, HIV, Adenovirus, herpes simplex Virus, Cytomegalovirus, Minute Virus of mice, adenoassoziiertes Virus, Sindbis Virus oder Vaccina Virus darstellt.
18. Ligandensystem nach Anspruch 9, bei welchem die kationische Struktureinheit mindestens 1 Lysin, mindestens 1 Arginin, mindestens 1 Histidin oder mindestens 1 Polyamin oder Kombinationen von mindestens zwei dieser Aminosäuren und Polyamine enthält.
19. Ligandensystem nach einem der Ansprüche 2 bis 18, bei welchem der Linker aus einer chemischen Konjugationsmethode zur Bindung von Molekülen an Aminogruppen, Hydroxygruppen, SH-Gruppen, Carboxylgruppen oder Aldehydgruppen resultiert.
20. Ligandensystem nach einem der Ansprüche 2 bis 18, bei welchem der Linker

eine fusiogene Substanz darstellt.

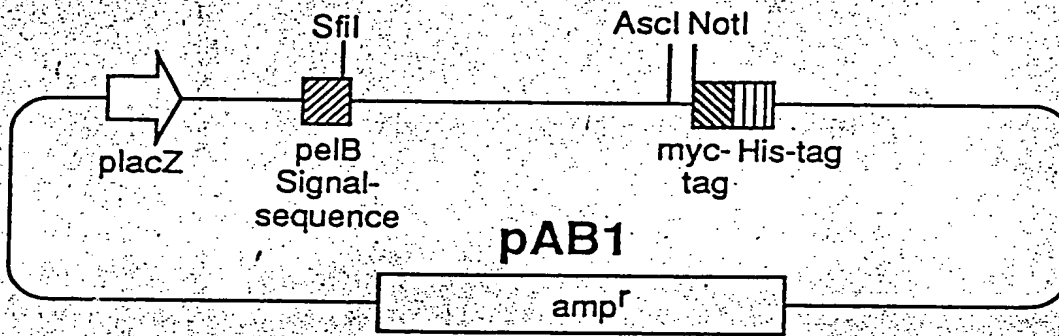
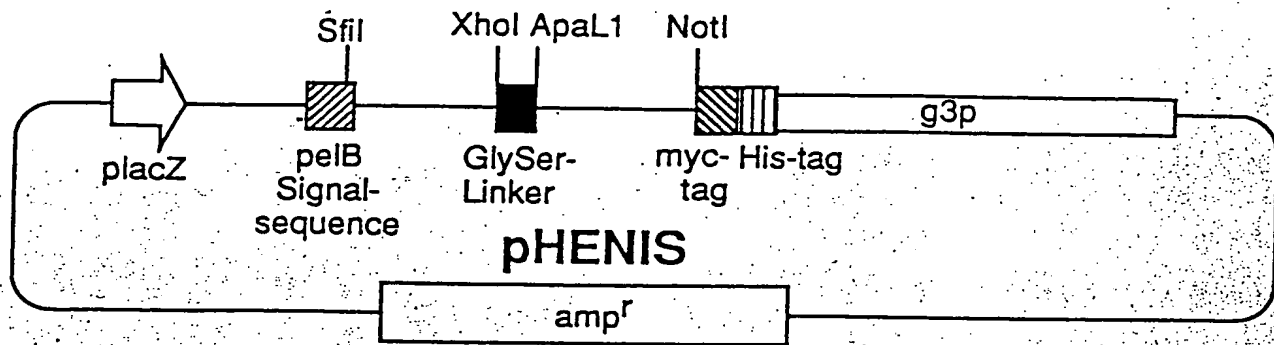
21. Ligandensystem nach Anspruch 20, bei welchem die fusiogene Substanz ein synthetisches fusiogenes Peptid, ein bakterielles fusiogenes peptid oder Protein oder das Fusionspeptid oder -protein eines Virus darstellt.
22. Ligandensystem nach einem der Ansprüche 2 bis 21, bei welchem das Verbindungsteil die Hinge-Region eines Antikörpers oder das Gal80-Protein in Kombination mit dem Gal4-Protein darstellt.
23. Ligandensystem nach einem der Ansprüche 1 bis 22 als Fusionsprotein mit Hilfe der Rekombination von Genen und Nukleotidsequenzen.
24. Ligandensystem nach einem der Ansprüche 1 bis 23, vermischt mit einem Genkonstrukt.
25. Ligandensystem nach Anspruch 24, bei welchem das Genkonstrukt
 - eine nackte RNA, eine nackte DNA, ein Plasmid,
 - eine nackte RNA, DNA oder ein Plasmid im Gemisch mit einem kationischen Polymer, Peptid, Protein, Lipid oder Phospholipid oder
 - ein Virus darstellt.
26. Verwendung eines Ligandensystems nach Anspruch 25 zur Herstellung eines Heilmittels
 - a) zur lokalen Verabreichung bei Erkrankungen der Haut, der Schleimhaut, des Nervensystems, der inneren Organe, der Gerinnung, des blutbildenden Systems, des Immunsystems, der Muskulatur, des Stützgewebes oder der Gelenke und zur Impfung zur Vorbeuge oder Therapie dieser Erkrankungen;
 - b) zur Injektion bei Erkrankungen der Haut, der Schleimhaut, des Nervensystems, der inneren Organe, der Gerinnung, des blutbildenden Systems, des Immunsystems, der Muskulatur, des Stützgewebes oder der Gelenke und zur Impfung zur Vorbeuge oder

Therapie dieser Erkrankungen.

27. Verwendung eines Ligandensystems nach Anspruch 25 zur Herstellung eines Heilmittels zur Behandlung von Zellen außerhalb des Gewebeverbandes bei Erkrankungen der Haut, der Schleimhaut, des Nervensystems, der inneren Organe, der Gerinnung, des blutbildenden Systems, des Immunsystems, der Muskulatur, des Stützgewebes oder der Gelenke und zur Impfung zur Vorbeuge oder Therapie dieser Erkrankungen.

Abb.1: Expressionsvektoren pHENIS und pAB1

HOE 96/F 322



Zusammenfassung

Mehrfach funktionelles Ligandensystem zur zielzellspezifischen Übertragung von Nukleotidsequenzen

Die Erfindung bezieht sich auf ein mehrfach funktionelles Ligandensystem zur zielzellspezifischen Übertragung von Nukleotidsequenzen bestehend aus mindestens einem zielzellspezifischen Liganden, mindestens einem Linker und mindestens einem genkonstrukt-spezifischen Liganden, wobei der genkonstrukt-spezifische Ligand einen direkt oder indirekt an das Genkonstrukt bindenden Antikörper oder einen Teil davon enthält; sowie die Verwendung des Ligandensystems zur Herstellung eines Hilfsmittels oder eines Impfstoffes zur Behandlung oder zur Vorbeuge einer Erkrankung der Haut, Schleimhaut, des Nervensystems, der inneren Organe, der Gerinnung, des blutbildenden Systems, des Immunsystems, der Muskulatur, des Stützgewebes oder der Gelenke.